

# 叶酸修饰多西紫杉醇纳米脂质体对肝癌 Bel-7402 细胞的体内外靶向性研究<sup>Δ</sup>

计竹娃\*, 钦富华, 夏晓静, 胡英<sup>#</sup>(浙江医药高等专科学校生物与制药学院, 浙江宁波 315100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1325-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.09

**摘要** 目的:研究叶酸(FA)修饰多西紫杉醇(DOC)纳米脂质体(L-DOC-FA)对肝癌 Bel-7402 细胞的体内外靶向性。方法:采用细胞活性检测试剂盒分别检测 0、1、2、5、10、20 μg/ml DOC、L-DOC、L-DOC-FA 培养细胞 24 h 后的细胞活性,计算细胞存活率;利用荧光素异硫氰酸酯标记 L-DOC、L-DOC-FA,检测肝癌细胞 Bel-7402 对 L-DOC、L-DOC-FA 的摄取率;<sup>125</sup>I 标记 L-DOC、L-DOC-FA,检测其在皮下肿瘤组织中的含量;取 28 只 Balb/c 裸鼠,背部 ih 肝癌细胞悬液复制肿瘤模型,模型复制成功后将裸鼠分为空白对照(生理盐水)组、DOC(3 mg/kg)、L-DOC(3 mg/kg,以 DOC 计)和 L-DOC-FA(3 mg/kg,以 DOC 计)组,每天尾 iv 相应药物 1 次,连续 30 d,测定各组裸鼠肿瘤的相对瘤体积。结果:DOC、L-DOC、L-DOC-FA 对肝癌 Bel-7402 细胞活性均有抑制作用,细胞存活率降低且呈浓度依赖性;与 DOC、L-DOC 比较,L-DOC-FA 作用后细胞活性更低,细胞存活率降低( $P<0.01$ )。细胞对 L-DOC、L-DOC-FA 的摄取率大小为 L-DOC-FA(69.5%)>L-DOC(31.2%),差异有统计学意义( $P<0.01$ );肿瘤组织中 L-DOC-FA 含量比 L-DOC 含量高( $P<0.01$ );3 mg/kg L-DOC-FA 比相同质量浓度 L-DOC、DOC 抑瘤效果更明显,相对瘤体积更小( $P<0.01$ )。结论:L-DOC-FA 在体内外均对肝癌 Bel-7402 细胞有明显的主动靶向性,并表现出了很好的体内外肿瘤靶向抑制效果。

**关键词** 叶酸修饰纳米脂质体;多西紫杉醇;靶向性;肝癌 Bel-7402 细胞;肿瘤抑制;裸鼠

## Study on Targeting of Folic Acid-modified Docetaxel Nano-liposome to Hepatocellular Carcinoma Bel-7402 Cells *in vivo* and *in vitro*

Ji Zhuwa, Qin Fuhua, Xia Xiaojing, Hu Ying (Biological and Pharmaceutical School, Zhejiang Medical College, Zhejiang Ningbo 315100, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the targeting of folic acid (FA)-modified docetaxel (DOC) nano-liposome (L-DOC-FA) to hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells *in vivo* and *in vitro*. METHODS: The cell viability and survival rate of Bel-7402 cells was tested by CCK-8 kit after treated with 0, 1, 2, 5, 10 and 20 μg/ml DOC, L-DOC and L-DOC-FA for 24 h. And then, the fluorescein isothiocyanate was used to label L-DOC and L-DOC-FA nano-liposome, and the rate of L-DOC and L-DOC-FA absorbed by hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells were detected. <sup>125</sup>I was used to label L-DOC and L-DOC-FA nano-liposome, and then the contents of them in the subcutaneous tumor tissues were detected. 28 Balb/c naked mice were selected and given liver cell suspension via back ih to induce tumor model. After modeling, naked mice were divided into blank control group (normal saline), DOC group (3 mg/kg), L-DOC (3 mg/kg, by DOC) and L-DOC-FA (3 mg/kg, by DOC). They were given relevant medicine intravenously once a day for consecutive 30 d. The relative tumor volume in naked mice was detected. RESULTS: DOC, L-DOC and L-DOC-FA all inhibited the cell viability of Bel-7402 cells, the survival rate of cells decreased in concentration-dependant manner; compared with DOC and L-DOC, the cell viability decreased after treated with L-DOC-FA, the survival rate of cells decreased ( $P<0.01$ ). The rate of L-DOC and L-DOC-FA absorbed by Bel-7402 cells in descending order as L-DOC-FA (69.5%)>L-DOC (31.2%), with statistical significance ( $P<0.01$ ). The content of L-DOC-FA in tumor was significantly more than that of L-DOC ( $P<0.01$ ). In addition, 3 mg/kg L-DOC-FA showed better inhibitory effect than 3 mg/kg L-DOC and DOC on tumor, and the relative tumor volume was smaller ( $P<0.01$ ). CONCLUSIONS: L-DOC-FA has obvious targeting to Bel-7402 cells *in vivo* and *in vitro*, and shows good inhibitory effect on tumor *in vivo* and *in vitro*.

**KEYWORDS** Folic acid-modified nano-liposome; Docetaxel; Targeting; Liver cancer Bel-7402 cells; Tumor inhibition; Naked mice

*Bras Parasitol Vet*, 2012, 21(3):243.

- [11] 朱雨晴,石森林,吴瑾瑾,等.猕猴桃根多糖多相脂质体口服液对 CCl<sub>4</sub>所致实验性急性肝损伤的药效作用[J].中华中医药学刊,2013,31(12):2665.
- [12] 陈宝芝,李生,吴金滢,等.北五味子粗多糖对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J].吉林大学学

报:医学版,2014,40(1):92.

[13] Cigremis Y, Turel H, Adiguzel K, et al. The effects of acute acetaminophen toxicity on hepatic mRNA expression of SOD, CAT, GSH-Px, and levels of peroxynitrite, nitric oxide, reduced glutathione, and malondialdehyde in rabbit[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 323(1/2):31.

[14] Pirincioğlu AG, Gokalp D, Pirincioğlu M, et al. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(15):1220.

Δ 基金项目:浙江省科技厅公益性技术应用研究计划项目(No.2014C33225);宁波市科技局一般科研立项项目(No.2015C110027)

\* 讲师。研究方向:药物制剂新剂型与新技术。E-mail: zhijizhu-wa@163.com

# 通信作者:教授,博士。研究方向:药物制剂新剂型与新技术。电话:0574-88222707

(收稿日期:2015-09-26 修回日期:2016-01-05)  
(编辑:林静)

多西紫杉醇(Docetaxel, DOC)作为一线抗癌药物被广泛用于临床和实验研究中,对多种癌症均有很好的治疗效果<sup>[1]</sup>。目前,临床上用的DOC一般用聚山梨酯60来作为溶剂,而聚山梨酯60具有溶血性、黏性大、易引起过敏反应(如休克、低血压和皮疹等)等缺点<sup>[2]</sup>,所以DOC新剂型的研究具有重要意义。纳米脂质体是一种生物相容性很好的纳米载体,可以装载不同性质(水溶性和脂溶性药物均可装载)的药物<sup>[3]</sup>。其具有类似于细胞膜的结构,进入人体血液循环后不会被机体轻易地清除掉,而能长时间地停留在体内,使药物能够长时间地作用于病灶部位而发挥治疗作用。这不仅增加了药物的治疗效果,而且减少了药物的给药剂量,从而降低毒性。增加纳米脂质体的主动靶向性能够使药物发挥更好的治疗效果。叶酸(FA)受体是许多肿瘤细胞膜表面具有的一种特异性结合FA的位点<sup>[4-5]</sup>。FA受体阳性的肿瘤细胞有宫颈癌HeLa细胞、人卵巢癌SKOV-3细胞、肝癌Bel-7402细胞等<sup>[6]</sup>。因此,在纳米脂质体上修饰FA分子后,可以高效特异性地主动靶向到FA受体阳性的细胞表面,从而达到靶向杀伤肿瘤细胞的作用。

在本研究中,笔者采用前期实验中制备的DOC纳米脂质体(L-DOC)和用FA来修饰后的纳米脂质体(L-DOC-FA),设计体内、外实验,研究L-DOC-FA对人肝癌Bel-7402细胞的主动靶向性和抑制作用,期望所得结果可为临床医师和科学工作者治疗肿瘤疾病或研发新型抗肿瘤药物提供更好的思路和参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

FJ-200高速分散匀质机(东莞市谱标实验器材科技有限公司);RE-5003旋转蒸发器(上海耀特仪器厂);Multiskan MK3酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];FACSCanto流式细胞仪(美国BD公司);Neutron RAE II伽马射线检测仪、FJ391A2放射性活度计(北京核仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

靶向分子FA(美国Sigma公司,批号:59-30-3,纯度:≥99%);N-*N*-羧基琥珀酰亚胺(NHS,批号:74124-79-1,纯度:≥98%);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC,批号:1892-57-5,纯度:≥98%)均购自上海延长生化科技发展有限公司;DOC粉末(西安天丰生物科技有限公司,批号:114977-28-5,纯度:≥99%);叔丁基甲醚、甲醇、无水乙醇、乙醚、异丙醇等(分析纯,广州化学试剂厂);DMEM培养基(上海康稳生物科技有限公司);CCK-8活细胞计数试剂盒(同仁化学研究所,批号:40203ES60);异硫氰酸酯(FITC,美国西格玛试剂公司)。实验中的纳米脂质体药物均为本课题组自己合成。

### 1.3 细胞

人肝癌Bel-7402细胞购自上海细胞库(40~50代细胞系),采用美国ATCC标准进行培养。

### 1.4 动物

5~7周龄Balb/c裸鼠,♂,30只,体质量20~25g,购自中山大学动物实验中心[许可证号:SCXK(粤)2004-0011]。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及活性检测

采用常规的肿瘤细胞培养方法,用含10%胎牛血清的

DMEM完全培养液,在37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养人肝癌Bel-7402细胞24h,传代的细胞密度为10<sup>4</sup> ml<sup>-1</sup>。活性检测采用经典的CCK-8试剂盒法。以0、1、2、5、10、20 μg/ml的DOC、L-DOC和L-DOC-FA分别作用于细胞24h后,弃掉培养液,加入含10% CCK-8工作液的培养液继续孵育20 min,然后在酶标仪450 nm波长处检测其光密度值(OD<sub>450</sub>)。其中试验组为加药处理+CCK-8,空白组为0 μg/ml处理+培养液,阴性对照组为0 μg/ml处理+CCK-8(排除CCK-8试剂本身在450 nm波长处的吸收)。OD<sub>450</sub>值越高,说明细胞活性越高。每组试验重复3次,计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(试验组OD<sub>450</sub>-空白组OD<sub>450</sub>)/(阴性对照组OD<sub>450</sub>-空白组OD<sub>450</sub>)×100%。DOC、L-DOC、L-DOC-FA的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)由Origin软件计算得出。

### 2.2 细胞摄取率检测

采用FITC标记法分别标记L-DOC和L-DOC-FA,然后用标记好的脂质体分别与肝癌Bel-7402细胞在培养箱(37℃、5%CO<sub>2</sub>)中孵育2h,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞3次,直至除去细胞外的脂质体,并设置空白对照(不加药)。用胰蛋白酶消化液将细胞消化下来后收集,再加入适量的PBS溶液分散。然后在流式细胞仪中检测细胞中FITC的荧光强度。每份样品的统计数量为10 000个细胞。细胞对脂质体的摄取率用细胞中FITC的荧光强度百分率来表示。

### 2.3 <sup>125</sup>I标记及肿瘤组织中药物含量检测

用氯胺T氧化法来标记L-DOC和L-DOC-FA纳米脂质体,标记的放射性同位素为<sup>125</sup>I。具体过程为:将40 μl的L-DOC和L-DOC-FA分别与300 μCi碘化钠(Na<sup>125</sup>I)和100 μl 8 mg/ml的氯胺T在pH 7.5、室温环境中混合反应30 min。再将上述混合液用一定分子质量的透析袋除去多余的<sup>125</sup>I,直至没有<sup>125</sup>I的伽马射线活度为止。<sup>125</sup>I标记的L-DOC和L-DOC-FA避光低温保存。将标记的样品分别通过尾iv到Balb/c荷瘤鼠肝癌体内,称量小鼠的体质量,24h后取下背部的肿瘤,放入预先称质量的试管中,在电子天平上称量肿瘤组织的质量,而后测量肿瘤组织的比放射性活度(cpm/g),并计算其%ID/g值(每1g组织摄入注入量的百分数):%ID/g=组织的比放射性活度(cpm/g)/注入标记物的总放射性活度(cpm)×100%。

### 2.4 肿瘤模型的构建与治疗

取对数生长期的肝癌细胞,将细胞消化后,制成细胞悬浮液,分别在裸鼠背部ih 100 μl细胞悬浮液(大约10<sup>7</sup>个/L),将裸鼠继续放动物房(SPF级)喂养1周后,通过肉眼观察肿瘤生长情况,并用游标卡尺测量肿瘤大小。等肿瘤长到100 mm<sup>3</sup>后将所有荷瘤鼠随机分为4组,即空白对照(生理盐水)组、DOC(3 mg/kg)组、L-DOC(3 mg/kg,以DOC计)组和L-DOC-FA(3 mg/kg,以DOC计)组,每组7只。尾iv相应药物,每隔3d进行肿瘤大小的观察并计算相对瘤体积:相对瘤体积=给药后不同时间点瘤体积大小/给药前瘤体积大小×100%。

### 2.5 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行结果处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。P<0.05表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 细胞活性检测结果

0~20 μg/ml的DOC、L-DOC和L-DOC-FA都能不同程度地引起细胞活性下降,而L-DOC-FA对细胞活性的影响最为明显,其中10 μg/ml[10 μg/ml最接近DOC对细胞的IC<sub>50</sub>值(9.1 μg/ml),故以此质量浓度进行统计分析]的DOC、L-DOC和L-DOC-FA对细胞活性的影响大小为DOC<L-DOC<L-DOC-FA。与10 μg/ml DOC比较,L-DOC、L-DOC-FA作用后细胞存活率降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与10 μg/ml L-DOC比较,同质量浓度L-DOC-FA作用后细胞存活率显著降低( $P<0.01$ )。结果显示,低质量浓度的L-DOC-FA即能够起到明显的抑制效果,分析其原因可能为FA能将药物主动靶向到细胞,使细胞中药物的有效浓度提高。不同质量浓度DOC、L-DOC、L-DOC-FA与细胞孵育24 h后细胞存活率检测结果见表1。

表1 不同质量浓度DOC、L-DOC、L-DOC-FA与细胞孵育24 h后细胞存活率检测结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

Tab 1 The survival rate results of cells after treated with various concentrations of DOC, L-DOC and L-DOC-FA for 24 h( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

质量浓度, μg/ml	DOC	L-DOC	L-DOC-FA
0	99.9±2.1	98.9±1.8	99.1±2.5
1	87.3±4.1	75.6±2.8	69.1±3.1
2	70.5±1.2	54.2±4.1	41.5±2.1
5	62.3±2.4	51.2±2.8	30.2±3.5
10	51.2±2.2	43.5±4.5*	24.2±3.1***
20	45.9±1.1	34.5±4.8	20.1±2.6

注:与10 μg/ml DOC比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与10 μg/ml L-DOC比较,# $P<0.01$

Note: vs. 10 μg/ml DOC, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. 10 μg/ml L-DOC, # $P<0.01$

#### 3.2 细胞摄取率检测结果

L-DOC组的细胞摄取率为32.1%,而L-DOC-FA组的细胞摄取率为69.5%,明显高于L-DOC组和空白对照(不加药)组的摄取率( $P<0.01$ ),说明FA的修饰使脂质体能主动靶向到细胞。FITC标记的L-DOC和L-DOC-FA分别与细胞孵育2 h后的流式细胞图见图1、荧光强度检测结果见图2。

#### 3.3 肿瘤组织中药物含量的检测结果

与空白对照组比较,L-DOC、L-DOC-FA组荷瘤鼠肿瘤组织中药物含量显著增加( $P<0.01$ ),L-DOC组的%ID/g值为4.6%,显著低于L-DOC-FA组的31.5%( $P<0.01$ )。荷瘤鼠肿瘤组织中药物含量的检测结果见图3。

#### 3.4 肿瘤治疗效果研究

DOC几乎与空白对照的抑制效果相同,L-DOC能够在开始阶段抑制肿瘤的生长,但是最后肿瘤还是继续快速生长。而L-DOC-FA能一开始就抑制住肿瘤的生长,30 d后肿瘤体积没有明显生长,被很好地抑制住了。这些结果正好与药物的靶向性结果相关。与空白对照组、DOC、L-DOC组比较,L-DOC-FA组荷瘤鼠的瘤体积最小,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。荷瘤鼠的肿瘤体积测定结果见图4。

### 4 讨论

纳米脂质体被认为具有很好的被动靶向性,能够被单核

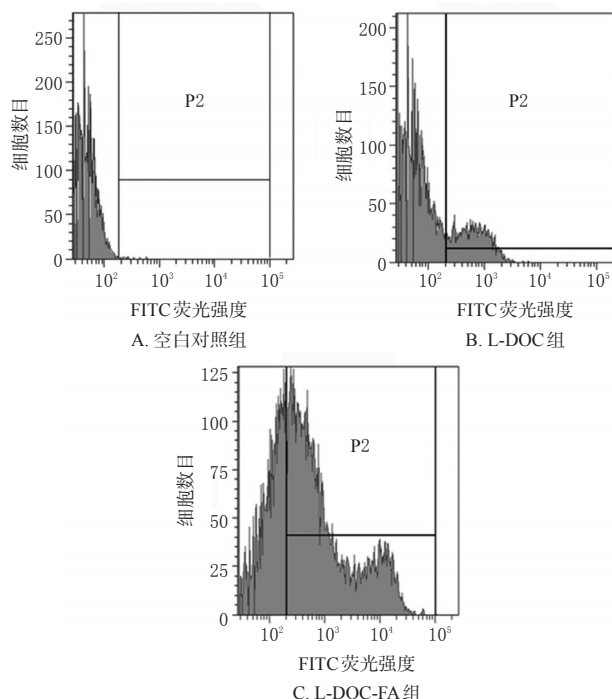


图1 FITC标记的L-DOC和L-DOC-FA分别与细胞孵育2 h后流式细胞图

Fig 1 Flow cytometry of cells after treated with FITC labeled L-DOC and L-DOC-FA for 2 h

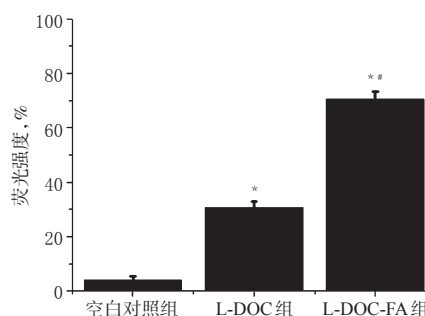


图2 FITC标记的L-DOC和L-DOC-FA分别与细胞孵育2 h后细胞中FITC的荧光强度检测结果

注:与空白对照组比较,\* $P<0.01$ ;与L-DOC组比较,# $P<0.01$

Fig 2 The fluorescence intensity results of cells after treated with FITC labeled L-DOC and L-DOC-FA for 2 h

Note: vs. blank control group, \* $P<0.01$ ; vs. L-DOC group, # $P<0.01$

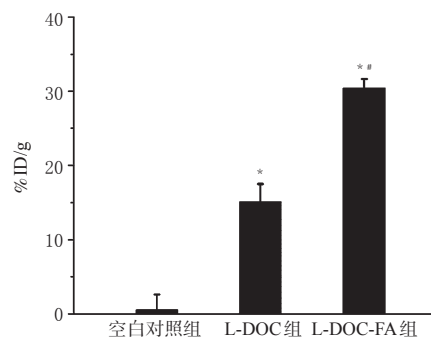


图3 荷瘤鼠肿瘤组织中药物含量的检测结果

注:与空白对照组比较,\* $P<0.01$ ;与L-DOC组比较,# $P<0.01$

Fig 3 The content results of drug in tumor tissue of tumor-bearing mice

Note: vs. blank control group, \* $P<0.01$ ; vs. L-DOC group, # $P<0.01$

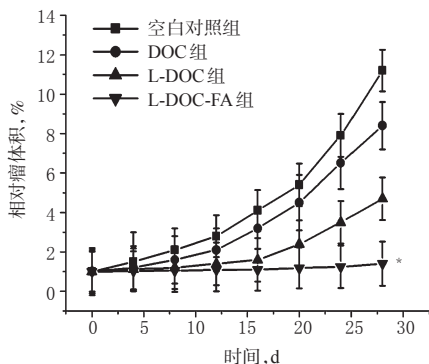


图4 荷瘤鼠相对肿瘤体积测定结果

注:与空白对照组、DOC、L-DOC组比较, \* $P < 0.01$

Fig 4 The relative tumor volume results of tumor-bearing mice

Note: vs. blank control, DOC and L-DOC group, \* $P < 0.01$

巨噬细胞系统的巨噬细胞吞掉,选择性地浓集于体内网状上皮系统(RES)丰富的组织中<sup>[7-9]</sup>。本研究中制备的纳米脂质体,从体外细胞摄取的结果来看,L-DOC-FA的摄取百分率高达69.5%,显著高于L-DOC和空白对照的细胞摄取率,这与其被动靶向有关。相应的细胞活性结果表明,DOC、L-DOC和L-DOC-FA对细胞均具有浓度依赖性的活性抑制效果,但是DOC、L-DOC和L-DOC-FA的抑制效果依次增加,本课题组推测这是由于它们的细胞靶向性依次增加的结果。

进一步的研究考察了L-DOC和L-DOC-FA在肿瘤组织中的聚集情况。通过标记的放射性元素的活度分析,侧面反映了肿瘤中纳米脂质体的含量。L-DOC的含量为14.6%,显著低于L-DOC-FA的31.5% ( $P < 0.01$ )。虽然实体瘤的高通透性和滞留效应(EPR效应)能使纳米颗粒富集在肿瘤区域<sup>[10-13]</sup>,但是富集的量毕竟是有限的,如L-DOC在肿瘤组织的含量比较低。因此,本研究通过外加靶向分子FA,来增加药物的靶向特性。制备的L-DOC-FA可使药物主动靶向至肿瘤细胞的FA受体进行特异性结合,而使更多的药物进入到细胞中。此外,本研究小组通过尾iv给药的方式将DOC、L-DOC、L-DOC-FA(含有相同量DOC)分别注射到荷瘤鼠体内,发现对肿瘤抑制的效果为DOC < L-DOC < L-DOC-FA,从而在在体层面上证明了FA靶向的纳米脂质体可以高效地靶向到肿瘤区域而发挥抗癌效果。但是,本实验仍有一些不足之处,比如缺乏毒理实验等,对此本研究小组后续将进行有关L-DOC-FA的毒理实验。

综上所述,本小组制备的L-DOC-FA在体外可以高效地靶向进入肝癌细胞并起到很好的细胞抑制效果;体内主动靶向性明显,能够高富集在肿瘤组织区域,显著地抑制肿瘤生长。

#### 参考文献

[1] Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, *et al.* Prospective

randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(10): 2 095.

[2] Beteck RM, Smit F J, Haynes RK, *et al.* Recent progress in the development of anti-malarial quinolones[J]. *Malaria J*, 2014, 13(10): 1.

[3] Kang K, Lee C, Pyo H, *et al.* Preparation and characterization of nano-liposomes using phosphatidylcholine[J]. *Ind Eng Chem*, 2005, 11(6): 847.

[4] Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 41(2): 14.

[5] Parker N, Turk MJ, Westrick E, *et al.* Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay[J]. *Anal Biochem*, 2005, 338(2): 284.

[6] 汪小乐, 简晓顺, 庞廷媛, 等. 叶酸偶联壳聚糖载多西他赛纳米粒的制备[J]. *中国药房*, 2014, 25(29): 2 740.

[7] Aryal M, Arvanitis CD, Alexander PM, *et al.* Ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption for targeted drug delivery in the central nervous system[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 72(15): 94.

[8] Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery[J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 86(3): 215.

[9] 管庆霞, 华晓丹, 李伟男, 等. 载中药物靶向纳米给药系统的研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(7): 1 002.

[10] Wu G, Barth RF, Yang W, *et al.* Targeted delivery of methotrexate to epidermal growth factor receptor-positive brain tumors by means of cetuximab (IMC-C225) dendrimer bioconjugates[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(1): 52.

[11] Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, *et al.* A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(5): 872.

[12] Marchetti C, Palaia I, Giorgini M, *et al.* Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review[J]. *Oncotarget ther*, 2014, 7(6): 1 223.

[13] Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics[J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94(10): 2 135.

(收稿日期: 2015-09-23 修回日期: 2016-02-01)

(编辑: 林 静)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅